



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Caracterización de las HDL en función del tipo
de proteína dietética en ratones ApoE



HDL caracterizacion depending on the type of
dietary protein in mice lacking ApoE

Autor

Marta Gómez Castillo

Directores

M.A. Navarro Ferrando

Javier Sánchez Marco

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado en Biotecnología-Curso 2020/2021

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	1
3.	INTRODUCCIÓN	2
3.1.	ATEROSCLEROSIS	2
3.2.	METABOLISMO LIPÍDICO	2
3.3.	ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	4
3.3.1.	RATONES KNOCK-OUT APOE	4
3.4.	APOLIPOPROTEÍNA A-I Y A-IV.	4
3.5.	GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LAS HDL	5
3.5.1.	ABCA1.....	5
3.5.2.	LCAT (Lecitina colesterol aciltransferasa)	5
3.5.3.	SRB1	6
3.5.4.	PLTP (phospholipid transfer proteín).....	6
3.5.5.	PON1 (Paraxonasa1)	6
3.6.	INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL DESARROLLO DE ATEROSCLEROSIS	6
4.	OBJETIVOS.....	7
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
5.1.	MATERIAL BIOLÓGICO Y DIETAS EXPERIMENTALES	7
5.2.	SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS MEDIANTE FPLC	8
5.3.	PARÁMETROS PLASMÁTICOS.....	8
5.3.1.	DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE COLESTEROL TOTAL	8
5.3.2.	DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE FOSFATIDILCOLINA	9
5.3.3.	DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA ESFINGOMIELINA	9
5.3.4.	DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA	10
5.4.	EXTRACCIÓN DE RNA DE MUESTRAS HEPÁTICAS.....	11
5.5.	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA MEDIANTE ELECTROFORESIS.....	12
5.6.	REAL TIME PCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LAS HDL	12
5.6.1.	RT- PCR	12
5.6.2.	PCR A TIEMPO REAL.....	12
5.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	13
6.	RESULTADOS	13
6.1.	SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS MEDIANTE FPLC	13

6.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS.....	14
6.2.1. MACHOS.....	14
6.2.1.1. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE COLESTEROL TOTAL EN LAS FRACCIONES DE FPLC.....	14
6.2.1.2. DETERMINACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA EN LAS FRACCIONES DE FPLC ..	15
6.2.1.3. DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN LAS FRACCIONES DE FPLC.....	15
6.2.1.4. DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA	15
DETERMINACIÓN DE ApoA-I	16
A) ELISA DE ApoA-I EN PLASMAS INDIVIDUALES	16
B) ELISA EN FRACCIONES PARA ApoA-I	16
DETERMINACIÓN DE ApoA-IV	16
A) ELISA DE ApoA-IV EN PLASMAS INDIVIDUALES	16
B) ELISA FRACCIONES ApoA-IV MACHOS:	17
6.2.2. HEMBRAS	17
6.2.2.1. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE COLESTEROL TOTAL	17
6.2.2.2. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE FOSFATIDILCOLINA	18
6.2.2.3. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE ESFINGOMIELINA.....	18
6.2.2.4. DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA	18
DETERMINACIÓN DE ApoA-I	19
A) ELISA DE ApoA-I EN PLASMAS INDIVIDUALES	19
B) ELISA DE FRACCIONES PARA ApoA-I	19
DETERMINACIÓN DE ApoA-IV	19
A) ELISA DE ApoA-IV EN PLASMAS INDIVIDUALES	19
B) ELISA EN FRACCIONES PARA ApoA IV	20
6.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA MEDIANTE ELECTROFORESIS.....	20
6.4. REAL TIME PCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LAS HDL	20
6.4.1. CURVAS DE OPTIMIZACIÓN DE PRIMERS	20
6.4.2. RESULTADOS REAL TIME PCR	21
A) MACHOS.....	21
B) HEMBRAS	22
7. CONCLUSIONES.....	22
8. CONCLUSIONS.....	23
9. BIBLIOGRAFÍA	24

ABREVIATURAS

ABCA1: transportador dependiente de ATP, subfamilia A miembro 1

ABCG1: transportador dependiente de ATP, subfamilia G miembro 1

ADDE: agua destilada y desionizada

ApoA-I: apolipoproteína A-I

ApoA-IV: apolipoproteína A-IV

ApoB100: apolipoproteína B100

ApoC-II: apolipoproteína C-II

ApoC-III: apolipoproteína C-III

ApoE: apolipoproteína E

CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FPLC: cromatografía líquida de filtración en gel

HDL: lipoproteína de alta densidad

HDL-C: lipoproteína de alta densidad-colesterol

HDLn: lipoproteína de alta densidad naciente

HRP: peroxidasa de rábano

IDL: lipoproteína de densidad intermedia

KO: *knock-out*

LCAT: lecitina colesterol acil transferasa

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPL: lipoproteína lipasa

PON1: paraxonasa 1

PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos

PPIB: ciclofilina B

QM: quilomicrón

QMr: quilomicrón remanente

SRBI: receptor *scavenger* clase B tipo I

TCV: aporte calórico total

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

1. RESUMEN

La aterosclerosis es considerada como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Esta enfermedad inflamatoria crónica afecta a la pared arterial y su desarrollo es un proceso multifactorial. Se produce por una acumulación de grasa, colesterol y otras sustancias como células muertas en las paredes de las arterias dando lugar a una pérdida de elasticidad de la pared y formación de placas de ateroma.

Debido a la importancia de esta enfermedad y su lento desarrollo en el ser humano, es necesario el uso de modelos animales para llevar a cabo los ensayos experimentales. Uno de los animales más usados es el ratón KO ApoE en los cuales se puede acelerar la tasa de aterogénesis alimentándolos con una dieta occidental rica en grasas.

Con el fin de evaluar el papel de las fuentes proteicas de la dieta en el desarrollo de la aterosclerosis, en este proyecto se trabajó con 75 ratones KO ApoE de ambos sexos separados en tres grupos cada uno alimentado con un tipo de fuente proteica distinta (soja, pavo o pollo). Transcurridas 12 semanas de ingesta de esas dietas, se analizaron diversos parámetros relacionados con la enfermedad como colesterol total, fosfatidilcolina, esfingomielina, Apo-I, ApoA-IV y nivel de expresión a nivel de mRNA de genes relacionados con la funcionalidad de las HDL.

En los resultados obtenidos no se observaron cambios en el perfil de distribución de colesterol, fosfatidilcolina y esfingosina para ambos sexos y dietas experimentales. Los niveles de ApoA-I fueron independientes de la dieta para ambos sexos, sin embargo, en el caso de los machos fue la ingesta de pollo la que produjo un aumento en los niveles de ApoA-IV. La ingesta de pavo en machos produjo una disminución significativa en la expresión de *Pon1* y un aumento de *Abca1* en comparación con la proteína de soja. Sin embargo, la ingesta de soja está relacionada con una mayor expresión de *Srb1*. En hembras, la ingesta de pollo aumentó la expresión de *Pon1* frente a las demás mientras que la dieta de pavo aumentó la expresión de *Lcat* si lo comparamos con la dieta de soja.

2. ABSTRACT

Atherosclerosis is considered one of the main causes of morbidity and mortality in developed countries. This chronic inflammatory disease affects the arterial wall and its development is a multifactorial process. It is produced by an accumulation of fat, cholesterol and other substances such as dead cells in the walls of the arteries, leading to a loss of elasticity of the wall and the formation of atheroma plaques.

Due to the importance of this disease and its slow development in humans, it is necessary to use animal models to carry out experimental tests. One of the most used animals is the KO ApoE mouse in which the rate of atherogenesis can be accelerated by feeding them with a western diet rich in fat.

In order to evaluate the role of dietary protein sources in the development of atherosclerosis, this project worked with 75 KO ApoE mice of both sexes, separated into three groups, each fed with a different type of protein source (soy, turkey or chicken). After 12 weeks of ingestion of these diets, various parameters related to the disease were analyzed, such as total cholesterol, phosphatidylcholine, sphingomyelin, ApoA I, ApoA IV and expression level at the mRNA level of genes related to HDL functionality.

In the results obtained, no changes were observed in the distribution profile of cholesterol, phosphatidylcholine and sphingosine for both sexes and experimental diets. The levels of ApoA-I were independent of the diet for both sexes, however in the case of males it was the intake of chicken that produced an increase in the levels of ApoA-IV. The intake of turkey in males produced a significant

decrease in the expression of Pon1 and an increase of Abca1 compared to soy protein. However, soy intake is related to a higher expression of Srb1. In females, the intake of chicken increased the expression of Pon1 compared to the others, while the diet of turkey increased the expression of Lcat if we compared it with the soy diet.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ATHEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a la pared arterial y que puede causar diversas enfermedades cardiovasculares como enfermedad cardíaca isquémica, accidentes cerebrovasculares y enfermedad vascular periférica. Esta enfermedad es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países occidentales.(1)(2)

El desarrollo de la aterosclerosis se produce por una acumulación de grasa, colesterol y otras sustancias como células muertas en las paredes de las arterias dando lugar a una pérdida de elasticidad de la pared y la formación de placas de ateroma. Con el paso del tiempo, estas placas pueden llegar a obstruir las arterias o incluso se pueden desprender fragmentos los cuales acaban bloqueando vasos sanguíneos de un tamaño inferior. Todos estos factores pueden verse favorecidos por unos altos niveles de colesterol en sangre.

Este proceso está muy influenciado por las lipoproteínas plasmáticas, la genética, la edad y la hemodinámica del flujo sanguíneo en las arterias. Además, hay que tener en cuenta la implicación del sistema inmune innato y adaptativo los cuales se encuentran a menudo activados en respuesta a la hiperlipidemia (lipoproteínas oxidadas de baja densidad). (3)(4) La acumulación de macrófagos cargados de lípidos en el área subendotelial de la pared arterial es una característica de la aterosclerosis. Este hecho promueve respuestas inflamatorias en la pared arterial y conduce a múltiples consecuencias patológicas fatales como hemorragia, rotura o calcificación de los vasos sanguíneos.(2) Por otro lado, cabe destacar la relación entre la dieta y el desarrollo de la aterosclerosis por influir tanto en la composición lipoproteica plasmática, como en otros factores agravantes de esta enfermedad multifactorial.

3.2. METABOLISMO LIPÍDICO

El metabolismo lipídico se encuentra especializado en repartir lípidos a los tejidos periféricos o devolverlos al hígado para su reciclaje o limpieza. Para poder cumplir estas funciones y debido a la naturaleza apolar de los lípidos, es necesaria la formación de diferentes lipoproteínas para permitir su transporte por el torrente sanguíneo. Estas lipoproteínas son macromoléculas formadas por una monocapa lipídica anfipática que cubre un núcleo de lípidos hidrofóbicos. Además, contienen diferentes apoproteínas que aportan el componente proteico y que define su transporte y función. Las diferentes clases de lipoproteínas se pueden separar en función de su tamaño por una gran variedad de técnicas como la cromatografía líquida de filtración por gel o cromatografía líquida de exclusión por tamaño (FPLC).(5)(6)

Es posible distinguir tres vías principales, estando todas ellas interrelacionadas.

En la **ruta exógena** las grasas de la dieta (colesterol y triglicéridos) son empaquetadas para formar quilomicrones (QM) en las células epiteliales del intestino. Estos quilomicrones son liberados al sistema linfático donde se conjugan con la apolipoproteína B (ApoB-48) para posteriormente pasar a la circulación donde se unen a otras apolipoproteínas como ApoC-II, ApoC-III y ApoE en diferentes concentraciones.

La Apo C-II es un activador de la enzima lipoprotein lipasa (LPL), la cual se encarga de hidrolizar los triglicéridos de los quilomicrones en ácidos grasos libres que pueden ser absorbidos por las células. A medida que los quilomicrones van perdiendo triglicéridos, se forman los quilomicrones remanentes (QMr) que son retirados de la circulación sanguínea mediante su interacción con receptores hepáticos que reconocen la ApoE.(7)

En la **ruta endógena**, el hígado se encarga de sintetizar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que contienen colesterol y triglicéridos junto a ApoB-100. Del mismo modo que ocurre con los quilomicrones, las VLDLs son hidrolizadas por la LPL para la liberación de ácidos grasos y formación de VLDLs remanentes o IDLs. Las lipasas hepáticas hidrolizan las IDLs en lipoproteínas de baja densidad (LDLs) las cuales transportan principalmente colesterol. La LDL tiene dos destinos principales: ser captada por el hígado (70%) o por tejidos extrahepáticos (30%). En ambos casos la LDL es endocitada por el receptor de LDL (LDLR) que reconoce a la proteína Apo B-100. Las LDLs restantes se pueden unir a la ApoA libre secretada por el hígado formando la lipoproteína A. Éstas pueden unirse a la matriz extracelular formando depósitos que pueden causar la aterosclerosis en el caso de haber un exceso de LDL. (8)

En cuanto al **transporte reverso de colesterol**, consiste en la retirada de colesterol de los tejidos extrahepáticos para llevarlo de vuelta al hígado. Este proceso es crucial para la homeostasis de muchos órganos periféricos que no pueden catabolizar el colesterol. La HDL se origina en hígado e intestino en forma de Apo A-I naciente, siendo el hígado el principal órgano de producción. Esta proteína es secretada y capta fosfolípidos y colesterol por medio de la proteína ABCA1 del hígado y de células extrahepáticas originando una partícula Apo A-I pobre en lípidos de forma discoidal denominada pre β -HDL o HDL naciente. La pre β -HDL se transforma en una partícula esférica por acción de la enzima Lecitin-colesterol-aciltransferasa (LCAT) en una reacción donde transforma el colesterol libre en colesterol esterificado (CE). La partícula esférica se considera una HDL madura, que es capaz de captar colesterol de células extrahepáticas por medio de las proteínas ABCG1 y SRBI. (9) El colesterol es eliminado selectivamente en el hígado. El exceso de colesterol es excretado a la bilis y las HDL pobres en lípidos se hidrolizan o vuelven a la circulación para su relipidación.

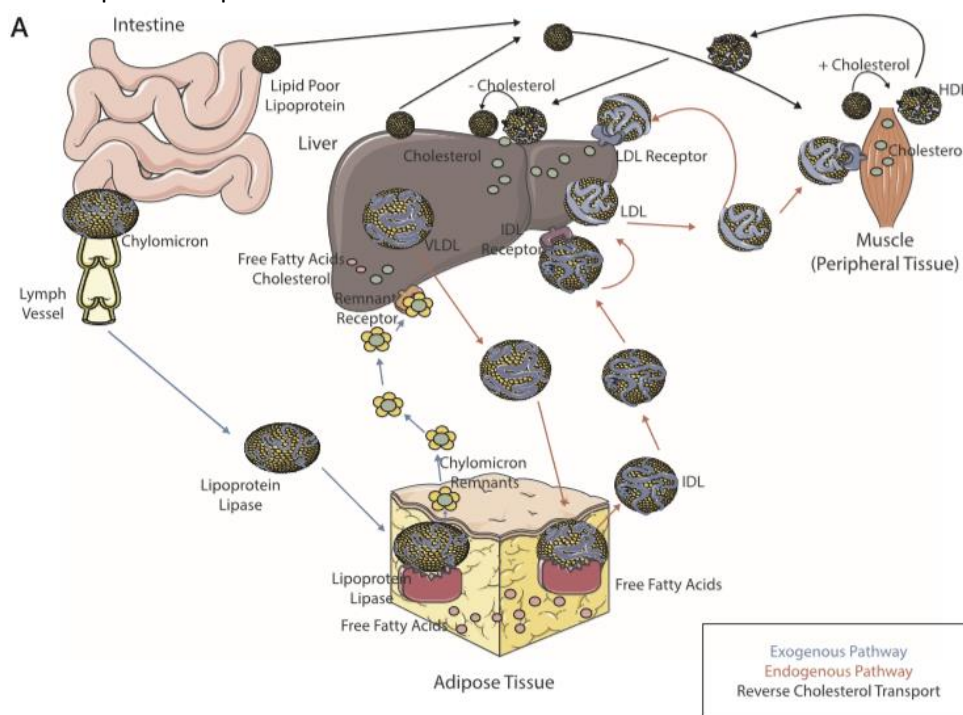


Imagen 1: esquema del metabolismo lipídico. (Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism)

3.3. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

El modelo animal ideal para el estudio de la aterosclerosis se tiene que asemejar a la anatomía y fisiopatología humana, así como su posible uso en la investigación médica y farmacéutica para obtener resultados extrapolables a la medicina humana. Además, deben ser fáciles de adquirir, mantener a un coste razonable y compartir la topografía de las lesiones con los humanos. La utilización de estos modelos animales en el estudio de la aterosclerosis es necesaria debido a la lenta evolución que tiene en el ser humano dicha enfermedad. (10)

En los últimos años, el ratón se ha convertido en la especie predominante para el estudio de la aterosclerosis debido a su rápida reproducción, la facilidad de manipulación genética y su capacidad para controlar la aterosclerosis en un periodo de tiempo razonable además de cumplir los requisitos comentados con anterioridad. (11) Sin embargo, el uso de ratones también tiene ciertos inconvenientes como su elevada resistencia a la aterogénesis, que contienen las HDL elevadas, sin CETP y que presentan dificultad en la recogida de muestras abundantes de sangre y para la disección de vaso de pequeño y mediano tamaño.(12)

3.3.1. RATONES KNOCK-OUT APOE

Debido a que el ratón tiene una resistencia al desarrollo de aterosclerosis alta y gracias a los avances en las técnicas de ingeniería genética, ha sido posible el desarrollo de modelos carentes de determinados genes como es el caso de la apolipoproteína E. El uso de estos ratones ha permitido estudiar la implicación de la proteína ApoE en el metabolismo de las lipoproteínas, la biología de los macrófagos o monocitos y la influencia de la dieta en el desarrollo de la arterosclerosis.

La tasa de aterogénesis que sufren los ratones KO ApoE puede ser notablemente acelerada en el caso de alimentarlos con una dieta occidental rica en grasas y colesterol al producirse un aumento de los niveles de lípidos en el plasma. Además, dichas lesiones no sufren ninguna modificación morfológica en sus características. (13)

La apoE tiene una función principal anti-aterogénica y es capaz de regular la homeostasis del plasma promoviendo la limpieza de lipoproteínas, quilomicrones e induce la secreción de VLDL por parte del hígado, así como el transporte reverso de colesterol.(14)

La ausencia de esta proteína impide el reconocimiento por parte del hígado de las lipoproteínas remanentes las cuales se acumulan a nivel vascular y en el plasma. Esto supone que las paredes de los vasos sanguíneos se engrosen y endurezcan perdiendo elasticidad favoreciendo al desarrollo de la aterosclerosis en un corto periodo de tiempo. (15)(16)

3.4. APOLIPOPROTEÍNA A-I Y A-IV.

La ApoA-I es una apoproteína sintetizada y secretada por el hígado y el intestino. Se caracteriza por ser la principal apoproteína de las HDL siendo esencial para la biogénesis de estas partículas y, además, influye en las propiedades de la HDL para prevenir la aterosclerosis. Cada partícula de HDL contiene de 2 a 5 moléculas de ApoA-I.

Por otro lado, la apoA-I libre de lípidos es capaz de mediar la salida de colesterol por la unión con el transportador ABCA1, contribuyendo así a la vía de transporte reverso de colesterol (RTC).(5)

Por otro lado, la ApoA-IV es sintetizada por el intestino delgado y el hígado para su posterior secreción a la linfa en respuesta a una alimentación con lípidos (17). Esta apoproteína se encuentra asociada a las HDL y los quilomicrones en el plasma, sin embargo, su papel en el metabolismo de las lipoproteínas todavía no ha sido definido completamente. Se han atribuido muchas funciones fisiológicas a la apoA-IV como su asociación al metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos regulando el transporte de los mismos y los niveles de colesterol. Además, también se considera que puede tener un papel importante en el transporte reverso de colesterol estimulando la actividad de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa), regulador de la función gástrica o ser un modulador de la homeostasis de la glucosa en sangre. (17)(18)

Se ha visto que una sobreexpresión de ApoA-IV en ratones KO ApoE, tiene un papel protector contra la formación de lesiones aorticas inducidas por la dieta e inhibe la colitis experimental.

3.5. GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LAS HDL

La HDL es una lipoproteína que juega un papel central en el transporte reverso de colesterol. Su principal función se centra en recoger el colesterol de los tejidos periféricos y transportarlos al hígado para su excreción por la bilis. Además, la HDL cumplen otras muchas funciones como actividad antiinfecciosa, antiinflamatoria, antitrombótica, vasodilatadora, antioxidativa, antiapoptótica o de reparación endotelial.(19)(20)

Las partículas de HDL son muy heterogéneas y difieren en las proteínas, lípidos, tamaño, forma y carga que poseen. Principalmente contienen un centro hidrofóbico de ésteres de colesterol y algunos triglicéridos rodeados por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas.(21)

3.5.1. ABCA1

Se ha visto que el transportador ABCA1 tiene un papel de gran relevancia en diferentes tejidos para mantener la homeostasis del colesterol e interfiere en una gran variedad de funciones fisiológicas como la formación de partículas de HDL por la fosfolipidación de la ApoA-I.

El ABCA1 transloca tanto colesterol libre como fosfolípidos de la membrana celular a la ApoA-I libre de lípidos. A través de un complejo reordenamiento, convierte la ApoA-I en una partícula discoidal con dos moléculas de ApoA-I que contiene colesterol y fosfolípidos.(21)

3.5.2. LCAT (Lecitina colesterol aciltransferasa)

Las pequeñas partículas de HDL formadas por la acción de ABCA1 en tejidos tanto hepáticos como extrahepáticos, van a pasar a formar HDL maduras por la acción de la LCAT.

Esta enzima es secretada principalmente por el hígado y circula en plasma unida a las HDL y las LDL donde es capaz de esterificar el colesterol libre para la formación de ésteres de colesterol y lisofosfatidilcolina. Debido a esto, la LCAT es necesaria para la formación de las partículas de HDL maduras y para mantener un flujo de colesterol libre entre las células y las partículas de HDL. Además, la LCAT puede ser considerada como una enzima o como transportador.(22)(23)

La actividad de esta proteína puede verse potenciada por la acción de diversos cofactores como la ApoA-I, ApoA-IV, ApoE y en algunos casos por la ApoC.

3.5.3. SRB1

El receptor SRB1 se encuentra presente en diferentes tejidos, pero se caracteriza por tener una alta afinidad por las HDL colesterol y ésteres de colesterol en el hígado. Este mecanismo es crítico para la captación de HDL y su posterior eliminación en la bilis, así como para la absorción de vitaminas liposolubles. (24)(25)

3.5.4. PLTP (phospholipid transfer proteín)

La PLTP pertenece a la familia de proteínas de unión y transferencia de lípidos y se encarga de catalizar la transferencia de diferentes lípidos incluidos fosfolípidos, diacilglicerol, cerebrósidos y lipopolisacáridos entre diferentes lipoproteínas. Es posible encontrar concentraciones elevadas de PLTP en los pulmones, placenta y ovarios, pero gran parte de esta proteína se produce en el hígado.

El rol fisiológico de PLTP se centra en la distribución y metabolismo de las HDL y en el transporte reverso de colesterol. Por otro lado, existen muchos estudios sobre el papel patológico de PLTP en relación con diversas patologías.(26)

3.5.5. PON1 (Paraxonasa1)

La paraxonasa1 es una enzima éster hidrolasa dependiente de Ca^{2+} asociada a HDL que protege a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y a las membranas celulares de la oxidación mediante la hidrólisis de los peróxidos lipídicos.(27) PON1 es sintetizada principalmente en el hígado y es secretada a la sangre donde se asocia preferiblemente con las HDL contribuyendo en su actividad antioxidante. Aunque se conocen diversos moduladores de estilo de vida y farmacéuticos para la actividad y expresión de PON1, los factores que más afectan son los diversos polimorfismos genéticos que existen y la influencia de la dieta.(28)

El mecanismo por el cual PON1 retarda la oxidación de las LDL no se conoce aún, pero parece estar implicada la hidrólisis de ácidos grasos truncados a partir de hidroxiperóxidos de fosfolípidos, ésteres de colesterol y triglicéridos, lo que da como resultado la producción de lisofosfolípidos, colesterol, diglicéridos y ácidos grasos oxidados.

3.6. INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL DESARROLLO DE ATEROSCLEROSIS

Desde hace tiempo es sabido que la ingesta de una dieta con bajas proporciones de sal, grasa y azúcar, pero grandes cantidades de diversas verduras y frutas puede reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y obesidad.(29) Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el aporte calórico total (TCV) correspondiente con las proteínas debe ser entre el 10 y el 35%.(30)

Existen diferentes tipos de dietas como la Mediterránea o la dieta Western que varían en las proporciones nutrientes de cada tipo que contienen. Esta última dieta se caracteriza por estar compuesta por un 21% w/w de grasa siendo 0,15-1,25% de colesterol. El uso de la dieta Western a diario en ratones KO ApoE supone un factor agravante en la aparición de aterosclerosis.

La relación entre el consumo de vegetales y frutas con la aterosclerosis ha sido demostrada en muchos estudios epidemiológicos observándose una reducción del riesgo de padecer dicha enfermedad. Sin embargo, la relación entre las diferentes fuentes de proteína dietética con la aterosclerosis no ha sido extensamente evaluada en comparación con otros

macronutrientes.(31) Existe una gran variabilidad en la composición de aminoácidos de las proteínas de soja, pavo y pollo en los diferentes estudios realizados.(30)

El hecho de que los aminoácidos puedan requerir transportadores específicos y que algunos receptores sean sensibles a estos compuestos, han permitido plantear la hipótesis de que podrían contribuir a la regulación de la proteostasis y al desarrollo de enfermedades.

Se han desarrollado diversos estudios que ponen en evidencia que los modelos animales alimentados con dietas con una fuente proteica de soja desarrollan menos aterosclerosis. Los análisis muestran una reducción del 13% de LDL-colesterol y un 11% de los niveles de triglicéridos sin aumentar las HDL-colesterol. (32)(33)

En el caso de alimentar a los ratones con una dieta western con proteína de pollo, se vio una reducción del desarrollo de placas de aterosclerosis en el arco aórtico comparado con los controles, así como una reducción en los niveles de citoquinas o del marcador de inflamación MCP-1. Sin embargo, no se vio cambio en los niveles plasmáticos de colesterol o TAG.(34)

Nuestro interés por estudiar las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se centró en la correlación inversa entre los niveles de HDL-C y el riesgo cardiovascular. Pero a medida que se ha avanzado en el conocimiento se ha visto que existe un alto grado de heterogeneidad de estas partículas sobre todo en condiciones patológicas donde cambios en la composición de las HDL y en su estado oxidativo se han asociado con la pérdida de su función fisiológica y desarrollo de patologías como la aterosclerosis.

4. OBJETIVOS

El principal objetivo de este proyecto ha sido el de evaluar la influencia de las fuentes de proteínas dietéticas animales (pavo y pollo) en comparación con la proteína de soja en la composición de las HDL en un modelo animal carente de apoE.

Para ello, se determinaron una serie de parámetros plasmáticos como la concentración de colesterol total, fosfatidilcolina, esfingomielina y cantidad de ApoA-I y ApoA-IV en las fracciones obtenidas mediante FPLC a partir de plasma de ratones KO ApoE. Además, se cuantificaron los niveles de expresión a nivel de mRNA de diversos genes relacionados con el metabolismo de las HDL como *Abca1*, *Lcat*, *Srb1*, *Pltp* y *Pon1*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y DIETAS EXPERIMENTALES

Los ratones requeridos para este proyecto se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Toda la manipulación de estos animales se realizó de acuerdo con las condiciones establecidas en el Real Decreto 53/2013 sobre protección de animales utilizados para experimentación. El protocolo a seguir fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Para la realización de este TFG se emplearon 75 ratones carentes de ApoE de los cuales había 45 machos y 30 hembras de dos meses de edad con sustrato genético C57BL/6J separados en tres grupos distintos.

La dieta con la que se alimentó a los ratones fue una dieta tipo Western u occidental purificada (colesterol al 0,15% (p/p) y grasa saturada de palma al 20%(p/p)). Cada uno de estos grupos tuvo una fuente de proteína diferente (11,2% (p/p)): soja, pavo o pollo.

Una vez las dietas fueron formuladas con todos sus ingredientes (Anexo Tabla 1), se liofilizaron y almacenaron al vacío en pellets a -20°C. Tras 12 semanas de alimentación con las distintas dietas, la sangre fue extraída del ventrículo izquierdo y se centrifugó para realizar la separación del suero y plasma con EDTA. Además, se recogieron muestras de hígado que fueron congeladas junto a las muestras de plasma a -80°C hasta su posterior utilización.

5.2. SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS MEDIANTE FPLC

La cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC) es una técnica cromatográfica en fase líquida que permite la separación de lipoproteínas de suero o plasma en función de su tamaño. Para la cuantificación de los parámetros plasmáticos que se explican en los siguientes apartados, fue necesario realizar un FPLC (GE Healthcare).

La columna está formada por una fase estacionaria (esferas porosas de pequeño tamaño formadas por un polímero entrecruzado de agarosa, Superose 6B) que es llenada con una solución tampón PBS pH 7,4. El tamaño de dichas esferas es lo que determina el rango de separación óptimo, en este caso $5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$ Da de peso molecular.

Gracias al paso de la fase móvil (PBS pH 7,4) a un flujo de 0,3 ml/min se produce la salida de las proteínas de la columna, que son detectadas por la absorción de la luz, a una longitud de onda de 280 nm. Los datos se registran en lo que se denomina diagrama de elución, en el cual se indica la posición de las proteínas que se han separado.

Partiendo de las muestras de plasma de los ratones, se realizaron mezclas tomando 5 µL de plasma todos animales que habían sido alimentados con el mismo tipo de dieta (procedimiento repetido para ambos sexos). Los tres pooles resultantes, dado que estamos trabajando con muestras de plasma, fue necesario diluirlos 1/6 en PBS para poder realizar la FPLC. De estas diluciones, se cargaron 100 µL en el loop y se recogieron fracciones de 500 µL en el colector rotulados desde A1 hasta D12.

5.3. PARÁMETROS PLASMÁTICOS

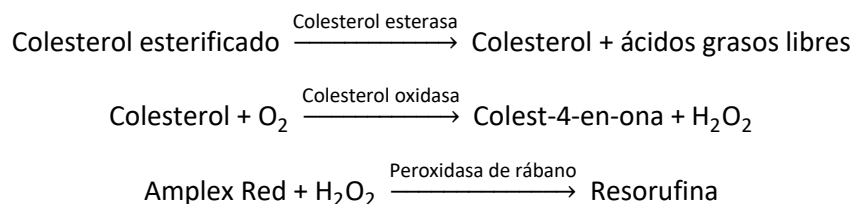
A continuación, se explican detalladamente los procedimientos seguidos para la determinación de diversos parámetros plasmáticos en muestras de ambos sexos.

5.3.1. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE COLESTEROL TOTAL

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de colesterol total presente en el plasma, se utilizó el kit fluorimétrico “*Amplex Red Reagent*” de Invitrogen™ sobre las fracciones lipoproteicas obtenidas por FPLC. Este kit permite la detección tanto del colesterol libre como el esterificado.

El reactivo Amplex Red es una sonda estable no fluorescente y altamente sensible a H_2O_2 generado en una gran cantidad de reacciones enzimáticas. En presencia de peroxidasa de rábano (HRP), el reactivo Amplex Red reacciona en estequiometría 1:1 con el H_2O_2 para

producir resorufina que es un compuesto altamente fluorescente el cual aumenta la sensibilidad del método. Las reacciones que tienen lugar son:



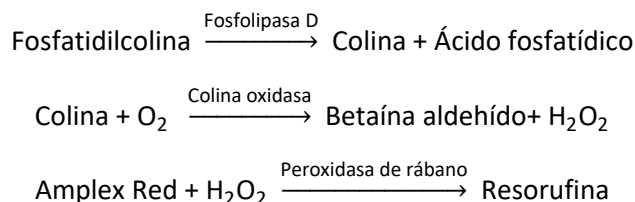
Para calcular la concentración de colesterol total presente en cada una de las fracciones, se construyó una recta patrón con un estándar de colesterol en un rango de 0 a 20 μM . Se añadieron 50 μL /pocillo de cada una de las disoluciones de la recta patrón por duplicado y de las fracciones obtenidas en la FPLC. Sobre estas muestras se añadieron de 50 μL /pocillo de la mezcla de reacción que contiene las enzimas y la disolución tampón necesaria para que las reacciones tengan lugar.

Una vez cargadas las placas, se incubaron durante 30 minutos a 37°C para la posterior medida de fluorescencia en el lector de placas “SPECTROstar OMEGA-BGM” Labtech con un filtro de excitación de 550 nm y de emisión de 595 nm. La concentración de colesterol de las muestras se determinó interpolando el valor de absorbancia en la recta patrón de colesterol.

5.3.2. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE FOSFATIDILCOLINA

La determinación de fosfatidilcolina presente en las fracciones obtenidas mediante FPLC se realizó también con la técnica fluorimétrica y el kit “Amplex Red Reagent” (*Molecular Probes*), descrito en el apartado 5.3.1.

A continuación, se detalla la secuencia de reacciones que tienen lugar, así como los diferentes enzimas y reactivos que están implicados:



Para la determinación de la concentración de fosfatidilcolina se preparó una recta patrón con un estándar de cloruro de colina en un rango de concentraciones de entre 0 y 20 μM . Se pipetearon 50 μL /pocillo de cada disolución de la recta patrón por duplicado y de cada una de las fracciones de la FPLC sin diluir. Sobre estas muestras se añadieron 50 μL de la mezcla de reacción la cual contiene las enzimas y reactivos necesarios diluidos en buffer 0,25M Tris/HCl, 250mM CaCl_2 (SIGMA), pH 8.

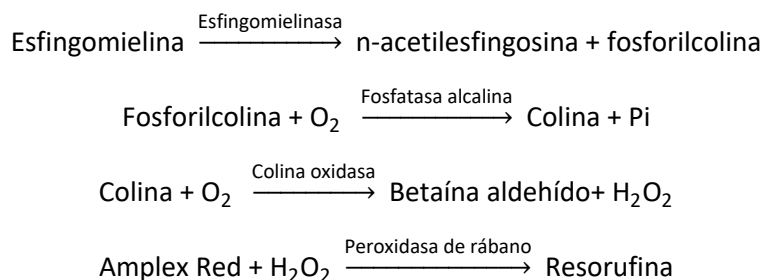
Posteriormente se incubó la placa a 37°C durante 45 minutos. La lectura de la fluorescencia y cálculo de la concentración de fosfatidilcolina se realizaron del mismo modo que en el apartado anterior.

5.3.3. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA ESFINGOMIELINA

En el caso de la determinación de la cantidad de esfingomielina, el procedimiento a seguir es el mismo que en el caso de la fosfatidilcolina con el Kit de reacción “Amplex Red Reagent”

(Invitrogen™). Ambos procesos difieren en la mezcla de reacción utilizada dado que son requeridas enzimas distintas para llevar a cabo otra secuencia de reacciones. Además, el buffer empleado en este caso es 0,5M Tris/HCl, 50 mM MgCl₂ (SIGMA), pH 7,4.

En este caso, la reacción previa se basó en la hidrólisis llevada a cabo por dos enzimas, la esfingomielinasa hidroliza la esfingomielina a ceramida (n-acetilesfingosina) y fosforilcolina, después la fosfatasa alcalina hidroliza la fosforilcolina a colina que es oxidada por la colina oxidasa a betaína y con liberación H₂O₂.



Posteriormente se incubó la placa a 37°C durante 45 minutos. La lectura de la fluorescencia y cálculo de la concentración de fosfatidilcolina se realizaron del mismo modo que en el apartado anterior.

5.3.4. DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA

La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) es un inmunoensayo utilizado, en nuestro caso, para la detección de las apolipoproteínas ApoA-I y ApoA-IV tanto en las fracciones lipoproteicas obtenidas por FPLC como en las muestras de plasmas individuales de todos los ratones de ambos sexos.

El fundamento de esta técnica está basado en la unión específica entre el antígeno (apolipoproteína) y un anticuerpo específico primario. Sobre el complejo formado entre ambos, se añade el anticuerpo anti-IgG que está unido a la fosfatasa alcalina y que se une de manera selectiva al anticuerpo primario.

Los reactivos necesarios son:

- Plasma de ratones ApoE o fracciones obtenidas del FPLC
- Agua ADDE
- Tampón fosfato salino: PBS pH 7,4 (NaCl 136 mM (SIGMA), KCl 0,2g/l (SIGMA), Na₂HPO₄ 1,44g/l (SIGMA) y KH₂NPO₄ 0,24 g/l (SIGMA))
- Tampón bicarbonato 0,2M (pH 9,6)
- Solución de bloqueo: PBS con leche en polvo descremada al 5%. Necesario ajustar el valor del pH a 7,4.
- TPBS: PBS con Tween 20 al 0,2% (pH 7,4)
- Tampón de dietanolamina al 10% en MgCl₂ (SIGMA) 0,5 mM (pH 9,8)
- Anticuerpo primario. En función de la apolipoproteína que queramos analizar, los anticuerpos y las concentraciones en las que son añadidos son diferentes:
 - ApoA-I: anticuerpo anti ApoA-I de ratón generado en conejo (BioDesign-K23001R) dilución 1/ 2.000 en TPBS
 - ApoA-IV: anticuerpo anti ApoA-IV humana generada en cabra (SantaCruz-sc-19036) dilución 1/1.000 en TPBS

- Anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina, siendo:
 - ApoA-I: anticuerpo Anti-IgG de ratón generada en conejo (SIGMA A3687) dilución 1/ 10.000 en TPBS
 - ApoA-IV: anticuerpo Anti-IgG humana generada en cabra (SIGMA-A4187) dilución 1/5.000 en TPBS
- Solución de revelado: p-nitrofenilfosfato al 0,1% en tampón de dietanolamina
- Placa de 96 pocillos de poliestireno MAXISORP

Para poder llevar a cabo el ensayo de ELISA, se realizaron diluciones tanto de las fracciones de FPLC como de los plasmas individuales de ratones a una concentración de 1/40.000 para la determinación de la ApoA-I y de 1/20.000 en el caso de la ApoA-IV en tampón bicarbonato 0,2M (pH 9,6). Se cargaron 100 µL/pocillo de estas disoluciones en placas de 96 pocillos y se dejaron incubando toda la noche en la cámara fría a 4°C.

Al día siguiente, se eliminó la muestra no fijada por inversión de la placa de 96 pocillos y se añadieron 200 µL/pocillo de la solución de bloqueo dejándola actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados sucesivos añadiendo 200µL/ pocillo de TPBS durante 5 minutos con agitación y a temperatura ambiente para eliminar la solución de bloqueo.

Posteriormente se depositaron 100 µL/pocillo del anticuerpo correspondiente diluido en TPBS y se dejó incubando durante 1h 30 minutos a 37°C en la estufa. A continuación, se realizaron tres lavados con 200 µL/pocillo de TPBS durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente con agitación. Una vez realizados los lavados, se incubó la placa con 100 µL/pocillo de anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fosfatasa alcalina y diluido en TPBS durante 1h a 37°C para la ApoA-I y 45 minutos de incubación en el caso de la ApoA-IV.

Pasado este periodo de tiempo, se lavó la placa como en los pasos anteriores y se añadieron 200 µL/pocillo de solución de revelado preparada extemporáneamente dejando que se desarrollase el color durante unos minutos a 37°C. Finalmente se introdujo la placa en el lector "SPECTROstar nano-BGM Labtech" para medir la absorbancia a 405 nm de cada pocillo.

5.4. EXTRACCIÓN DE RNA DE MUESTRAS HEPÁTICAS

Para la extracción de RNA se partió de los hígados congelados de los ratones y se utilizó material estéril libre de RNAsas además de nieve carbónica a fin de mantener los tejidos a baja temperatura y evitar la degradación del RNA.

Se tomó una alícuota congelada para cada muestra de unos 50 mg de tejido y se introdujo en un tubo de polipropileno estéril que contenía 400 µL del reactivo de extracción (Trizol, *Thermo Fisher Scientific*) para realizar su homogenización utilizando un homogenizador mecánico MiniBeadBeater con bolas de 0.23cm (*BOLAS DE ZIRCONIO/SILICE*).

Posteriormente, el lisado resultante de la homogenización fue utilizado para realizar el proceso de purificación de RNA de muestras hepáticas establecido en el protocolo del Kit "*Direct-zol™ RNA Miniprep*" (Zymo Research, 279R2052). Este kit realiza una extracción de RNA en columnas de sílica, con una digestión usando DNasa para la eliminación del DNA genómico, posteriormente es lavado varias veces y eluido en agua libre de RNAsas.

5.5. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA MEDIANTE ELECTROFORESIS

Seguidamente se midió la concentración del RNA en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 UV/Vis por absorbancia a 260 y 280 nm. La concentración se calculó en base a que 1 mOD a la longitud de onda de A260 corresponde a una concentración de 40 µg/ml. Se comprobó que la relación entre las dos longitudes de onda se encontrase entre 1.8 y 2.0. Un ratio inferior reflejaría una posible contaminación con proteínas y DNA.

La calidad del RNA extraído se verificó por electroforesis de 400 ng de RNA de cada muestra en un gel de agarosa al 1% en 1xTBE que contenía bromuro de etidio, a 90 V durante 20 minutos. La visualización de las tres bandas características del RNA ribosómico (18S y 28S) se efectuó mediante un transiluminador de UV. Posteriormente, el RNA se mantuvo almacenado a -80 °C.

5.6. REAL TIME PCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LAS HDL

5.6.1. RT- PCR

Los reactivos utilizados para la RT-PCR pertenecen al *Kit commercial Prime Script™ Reagent* (Takara, Kusatsu, prefectura de Shiga, Japón).

Una vez comprobada la integridad del RNA mediante electroforesis, se llevaron 500 ng de RNA purificado a un volumen de 6,5 µl añadiendo agua DEPC. Posteriormente se le añadieron 3,5 µl de un mix de reacción formado por:

- 2 µL de Buffer
- 0,5 µL de Random 6 Mer
- 0,5 µL de oligo dT
- 0,5 µL de enzima retrotranscriptasa

De este modo, el volumen final para cada una de las muestras preparadas para la realización de la RT-PCR era de 10 µL. Posteriormente, tras centrifugar los eppendorf, se introdujeron en el termociclador y se incubaron las muestras a 37 °C durante 15 minutos, seguidos de 5 segundos a 85 °C. Una vez obtenido el cDNA, fue conservado a -80°C en el congelador hasta su utilización para la realización de PCR a tiempo real.

5.6.2. PCR A TIEMPO REAL

Se realizaron diversas Real Time PCR para la detección de cinco genes implicados en el metabolismo de las HDL. Los genes en estudio eran *Abca1*, *Lcat*, *Srb1*, *Pltp*, *Pon1*.

Antes de trabajar con las muestras de plasma y una vez diseñados los cebadores específicos para todos los genes, se realizaron las rectas de calibrado para cada una de las parejas. Para ello, se prepararon varias diluciones de cDNA a diferentes concentraciones (0, 1/2, 1/8 y 1/32).

Así se trataba de conseguir las condiciones en las que su eficiencia de amplificación fuese la correcta (entre 90-110%) y conocer la dilución de trabajo óptima en cada caso. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se indican en el apartado de resultados según las normas MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments).

Para llevar a cabo la cuantificación de los resultados de la qPCR, hace falta el uso de un gen de referencia para corregir los posibles errores producidos durante los procesos de retrotranscripción o extracción del RNA, los cuales puedan dar lugar a diferencias en la cantidad de cDNA en nuestras muestras de estudio. El gen de referencia es un gen cuya expresión no varía en las condiciones de estudio. En nuestro caso, se eligió como gen de referencia la ciclofilina B o *Ppib*, ya que es un gen muy estable en hígado.

En el mix de reacción de PCR necesario para cada gen en estudio, así como para el gen de referencia, se añadieron 5 µL SyberGreen, 2 µL de cDNA, el volumen necesario de primer (5µM) para obtener su concentración (Tabla 2), completando con H₂O libre de DNasas hasta 10µL.

La cantidad relativa de todos los mRNAs se expresó en relación con la expresión del gen de referencia mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para el diseño de la placa y la evaluación de los resultados se utilizó el programa *QuantStudio™ Real-Time PCR Software*. En cuanto al equipo empleado, fue un ViiA7 Real-Time PCR System para placas de 384 pocillos (Thermo Fisher Scientific).

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través del programa GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se presentaron como valores medios y desviaciones estándares de la media. El test de Shapiro-Wilk se utilizó para comprobar el tipo de distribución del conjunto de datos de cada grupo, mientras que el test de Bartlett se aplicó para estudiar la homogeneidad de varianza entre los grupos. En el caso de que se rechazara la hipótesis de distribución normal o de homogeneidad de la varianza, las diferencias entre los grupos se calcularon por el test de Mann-Whitney no paramétrico para muestras no apareadas. En caso contrario, las diferencias entre los grupos se evaluaron por el test paramétrico t de Student para muestras no apareadas.

Tanto el test paramétrico como el no paramétrico, comparan las medias aritméticas y cuestionan la hipótesis nula de que todas las medias de las poblaciones son iguales. El nivel de significación α se estableció en un valor de probabilidad inferior a 0,05 en todos los análisis estadísticos realizados. De esta forma, si el valor P obtenido por el test es $\alpha \leq 0,05$, se afirma con un 95% de confianza que las diferencias entre dos poblaciones en estudio son significativas.

6. RESULTADOS

6.1. SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS MEDIANTE FPLC

Una vez procesados los pools de plasma de los distintos grupos de animales, fue posible obtener diferentes diagramas de elución.

Las primeras partículas lipoproteicas eluidas se corresponden con las VLDL y los quilomicrones dado que son los de mayor tamaño y contenido lipídico. A continuación, son eluidas las LDL (de menor tamaño que las anteriores) y finalmente las HDL que son las lipoproteínas con un menor contenido lipídico y mayor concentración proteica. (Figura 1)

Las fracciones recogidas de cada pool de plasmas se utilizaron para la determinación de todos los parámetros plasmáticos que se detallan a continuación (colesterol total, fosfatidilcolina, esfingomielina, ApoA-I y ApoA-IV).

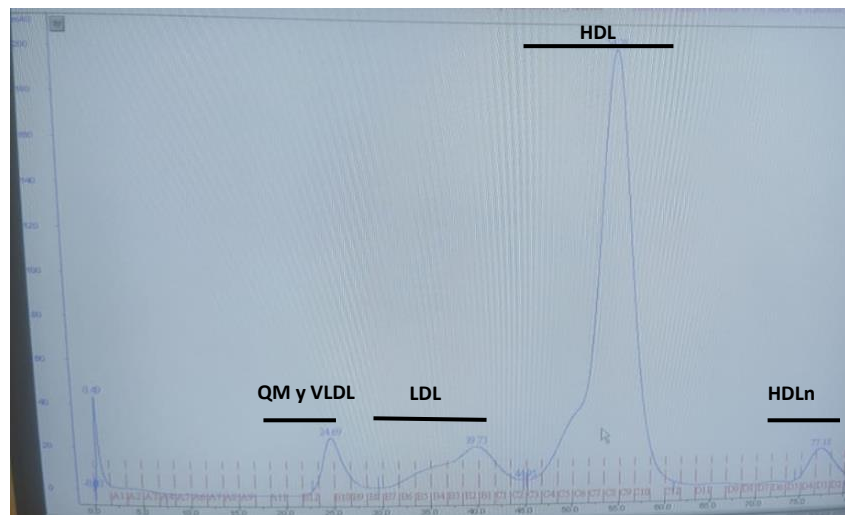


Figura 1. Perfil de la separación de lipoproteínas en el plasma de animales alimentados con la dieta de proteína de soja. Aparecen indicados los picos correspondientes con las QM, VLDL, LDL, HDL y HDL nacientes.

6.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS

6.2.1. MACHOS

6.2.1.1. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE COLESTEROL TOTAL EN LAS FRACCIONES DE FPLC

En la Figura 2 se muestra el perfil de colesterol total obtenido en $\mu\text{g}/\text{fracción}$ a partir de las fracciones de FPLC. Tal y como se observa en la figura, en los ratones KO ApoE, las lipoproteínas que contienen una mayor cantidad de colesterol son las VLDL, seguidas de las LDL y finalmente, las HDL. Este perfil es el característico de ratones KO ApoE dado que, al carecer de la apoE que es el ligando fundamental de reconocimiento de los QM remanentes por parte del hígado, las partículas de QMr, VLDL y LDL permanecen mucho más tiempo en la circulación.

Aunque todas las dietas tienen perfiles de colesterol similares, en el caso de los ratones macho alimentados con la proteína vegetal de soja, parece haber una cantidad superior de colesterol asociado a las lipoproteínas VLDL y las LDL frente al resto de dietas.

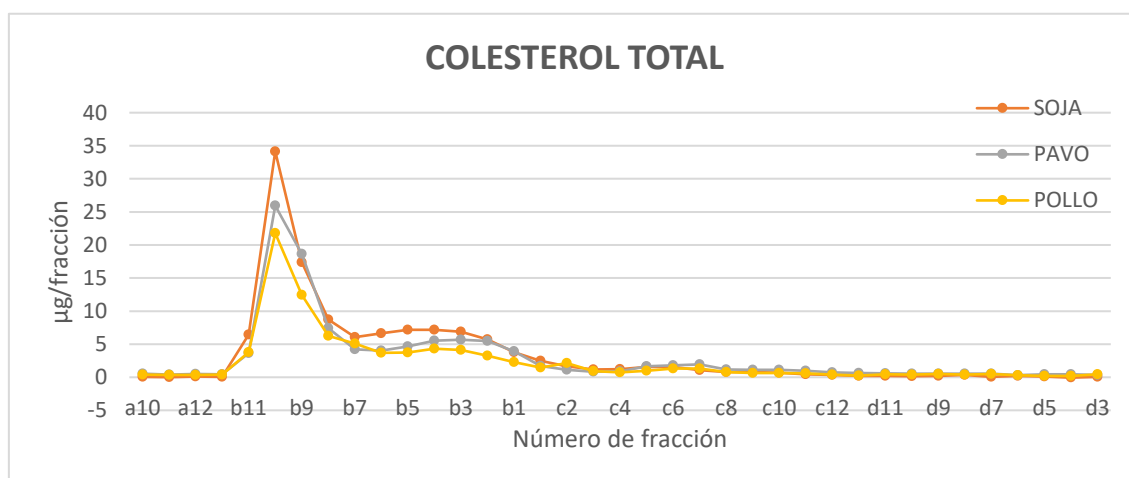


Figura 2. Perfil de colesterol total obtenido por el *Kit Amplex Red Reagent* en fracciones de FPLC de machos KO ApoE. La curva naranja se corresponde con el colesterol obtenido a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.1.2. DETERMINACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA EN LAS FRACCIONES DE FPLC

Tal y como se observa en la Figura 3, los tres grupos experimentales muestran patrones muy similares de distribución de fosfatidilcolina, siendo las HDL las que transportan la mayor parte de la fosfatidilcolina. Además, todos presentan un pequeño pico en las VLDL, LDL y en las HDL_n que son eluidas de la columna al final. Cabe destacar que los animales alimentados con la dieta enriquecida en proteína de pollo parece que presentan una cantidad inferior en $\mu\text{g/fracción}$ de fosfatidilcolina fundamentalmente en las LDL y en las HDL.

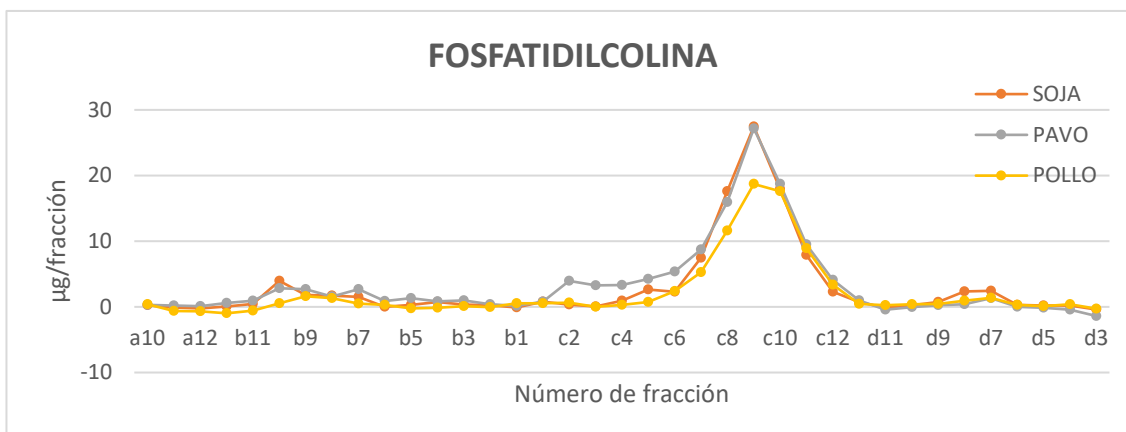


Figura 3. Perfil de fosfatidilcolina obtenido por el *Kit Amplex Red Reagent* en fracciones de FPLC de machos KO ApoE. La curva naranja se corresponde con la fosfatidilcolina obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.1.3. DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN LAS FRACCIONES DE FPLC

En la Figura 4 se observa el perfil de esfingomielina obtenido para los diferentes tipos de dietas. Al igual que pasaba con la fosfatidilcolina, la esfingomielina es transportada fundamentalmente por las HDL observándose un pico en las fracciones correspondientes a esas lipoproteínas (C6-C12). En este caso, la administración de proteína de origen animal provenientes de carnes de aves parece provocar una disminución de esfingomielina si se compara con la proteína de soja.

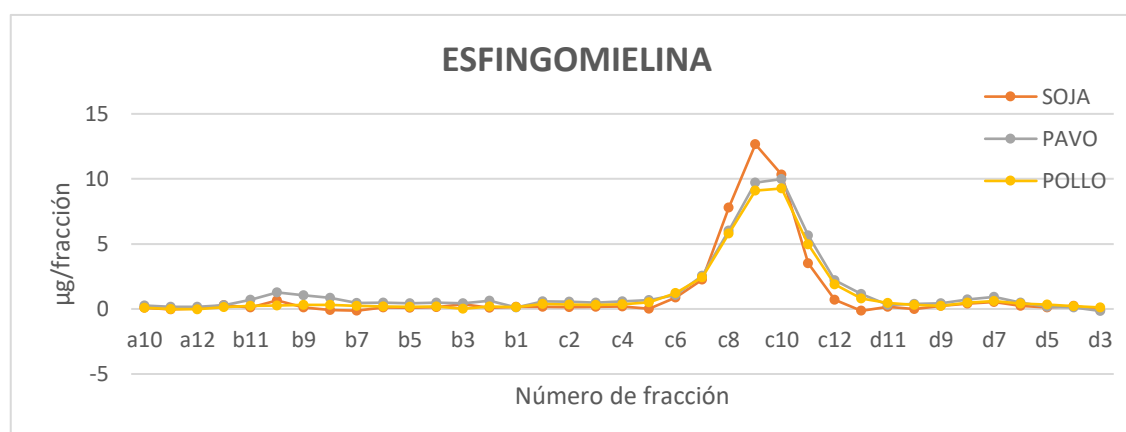


Figura 4. Perfil de esfingomielina obtenido por el *Kit Amplex Red Reagent* en fracciones de FPLC de machos KO ApoE. La curva naranja se corresponde con la esfingomielina obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.1.4. DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA

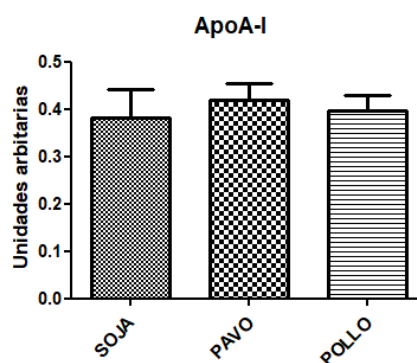
La determinación de ApoA-I y Apo A-IV tanto del plasma de los animales a nivel individual como de las fracciones de FPLC eluidas de la columna cromatográfica para cada grupo experimental se llevó a cabo mediante ELISA.

DETERMINACIÓN DE ApoA-I

A) ELISA DE ApoA-I EN PLASMAS INDIVIDUALES

La señal obtenida para la ApoA-I en el plasma de machos a nivel individual se puede observar en la Figura 5. Los machos KO ApoE alimentados con las diferentes dietas, no muestran diferencias significativas en la cantidad de apoA-I plasmática.

Figura 5: resultado de la absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA I en plasmas individuales de machos. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student.



B) ELISA EN FRACCIONES PARA ApoA-I

La distribución de Apo A-I en las fracciones lipoproteicas separadas por FPLC de los distintos grupos experimentales se muestra en la Figura 6. La ApoA-I es la principal proteína de las HDL y tal y como se observa en la Figura, la señal correspondiente a la apolipoproteína ApoA-I se encuentra fundamentalmente en las fracciones c3 a c12 donde se encuentran las HDL. Además, aparecen un leve pico en las fracciones de las HDL nacientes de D7 a D3. Este patrón es seguido por los diferentes grupos de animales siendo la señal obtenida muy similares para todos ellos.

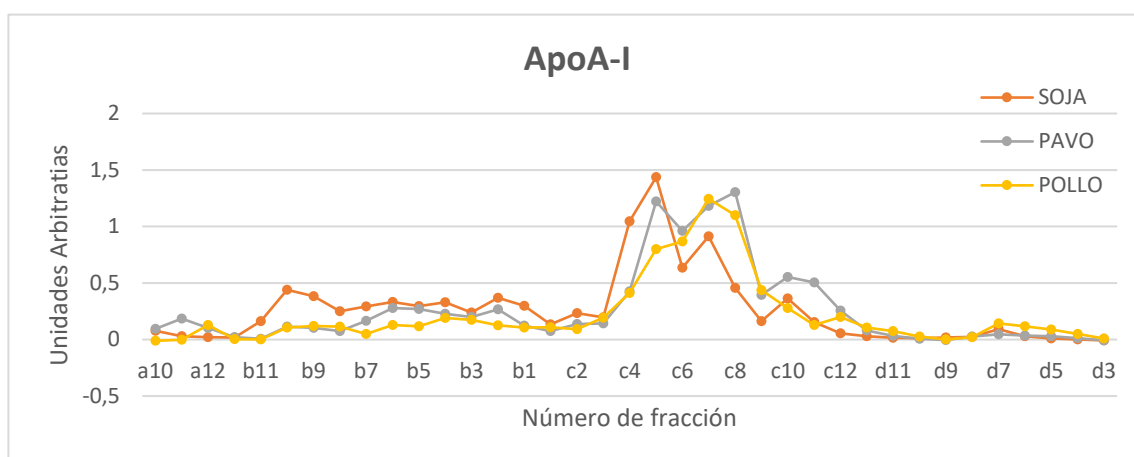


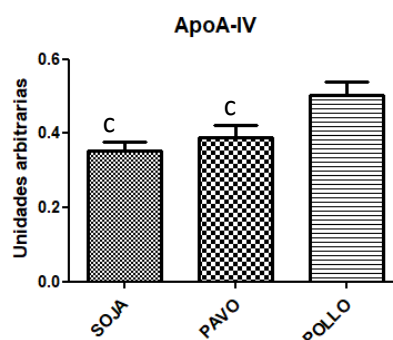
Figura 6: resultado de la absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA- I a partir de las fracciones de FPLC de machos. La curva naranja se corresponde con la señal de ApoA-I obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

DETERMINACIÓN DE ApoA-IV

A) ELISA DE ApoA-IV EN PLASMAS INDIVIDUALES

La señal obtenida para la ApoA-IV en el plasma de machos a nivel individual se puede observar en la Figura 7. Los animales alimentados con proteína de pollo muestran un valor de ApoA-IV significativamente mayor que los animales alimentados con los otros dos tipos de dietas.

Figura 7: Absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA-IV en plasmas individuales de machos. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. c, $p \leq 0,05$ -vs. Pollo.



B) ELISA FRACCIONES ApoA-IV MACHOS:

En la Figura 8 se muestra la distribución de ApoA-IV en las fracciones lipoproteicas separadas por FPLC de los distintos grupos experimentales para el caso de los machos. Los resultados siguen la misma tendencia que los obtenidos en el ELISA de ApoA-IV para plasmas individuales, en este caso los animales alimentados con la dieta de proteína de pollo parecen mostrar valores superiores de ApoA-IV en la fracción HDL en comparación con las otras dietas, mientras que en el caso de las dietas de soja y pavo la señal es similar.

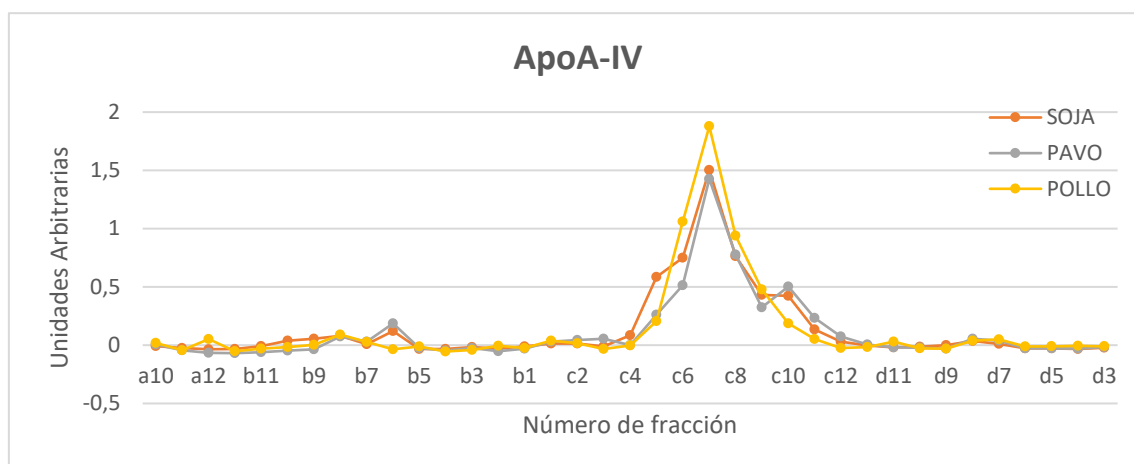


Figura 8: resultado de la absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA IV en machos frente al número de fracción correspondiente. La curva naranja se corresponde con la señal de ApoA-IV obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.2. HEMBRAS

6.2.2.1. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE COLESTEROL TOTAL

En la Figura 9 se muestra el perfil de colesterol total obtenido en $\mu\text{g}/\text{fracción}$ a partir de las fracciones de FPLC. Como ya se ha comentado, este perfil se corresponde con el típico de ratones KO ApoE, teniendo una mayor cantidad de colesterol asociado las VLDL seguido de las LDL y las HDL. En el caso de las hembras, el perfil de colesterol y su concentración es similar en todas las dietas utilizadas tanto para las VLDL, como las LDL o HDL.

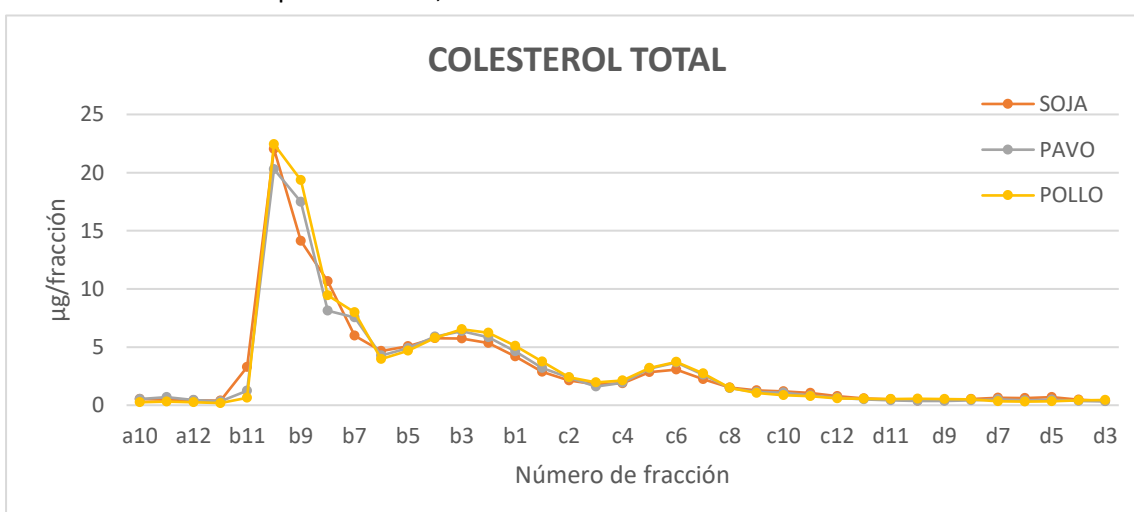


Figura 9. Perfil de colesterol total obtenido por el Kit Amplex Red Reagent en fracciones de FPLC de hembras KO ApoE. La curva naranja se corresponde con el colesterol obtenido a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.2.2. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE FOSFATIDILCOLINA

El perfil obtenido en $\mu\text{g}/\text{fracción}$ para la fosfatidilcolina se puede observar en la Figura 10 en la cual se muestra un pico principal en las fracciones c5 a c11 que se corresponde con las HDL. Además, parecen observarse unos valores ligeramente inferiores en la concentración de fosfatidilcolina para la dieta de soja en comparación con las otras proteínas de origen animal.

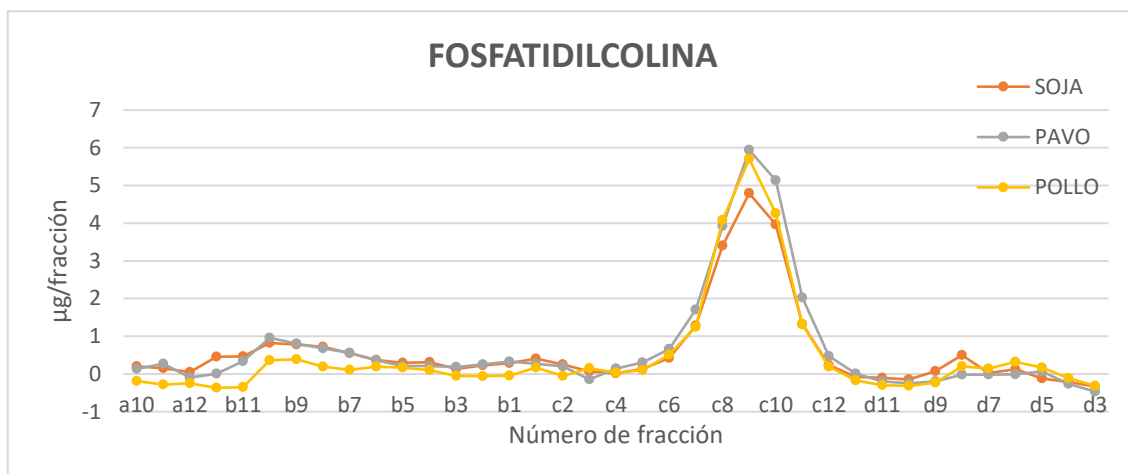


Figura 10. Perfil de fosfatidilcolina obtenido por el Kit Amplex Red Reagent en fracciones de FPLC de hembras KO ApoE. La curva naranja se corresponde con la fosfatidilcolina obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.2.3. DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE ESFINGOMIELINA

La distribución de esfingomielina obtenida en $\mu\text{g}/\text{fracción}$ para los distintos grupos experimentales se muestra en la Figura 11. El pico de esfingomielina corresponde con las fracción HDL, siendo aparentemente inferior en los animales alimentados con la dieta de proteína vegetal procedente de soja si lo comparamos con el pico de las dietas de proteína procedente de ave.

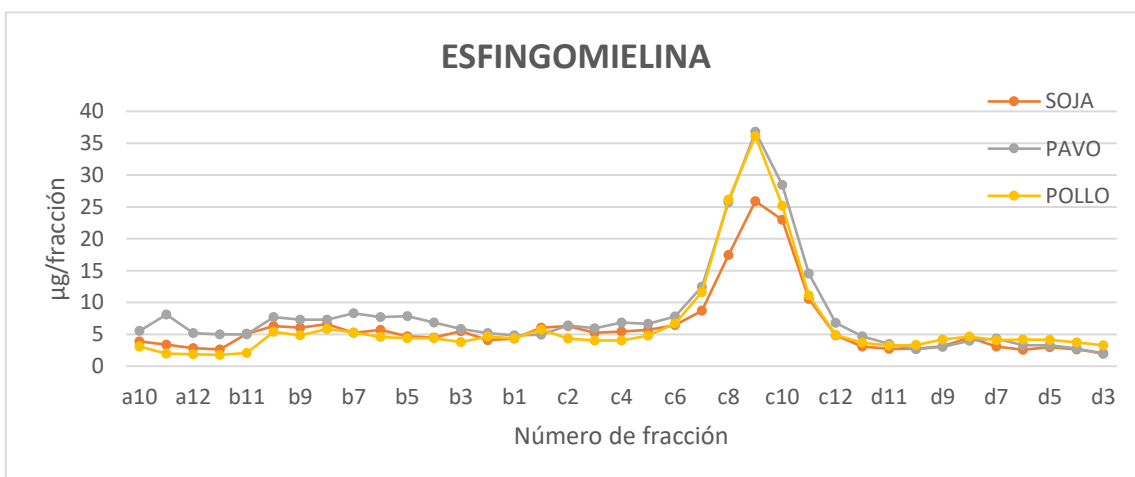


Figura 11. Perfil de esfingomielina obtenido por el Kit Amplex Red Reagent en fracciones de FPLC de hembras KO ApoE. La curva naranja se corresponde con la esfingomielina obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.2.2.4. DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA

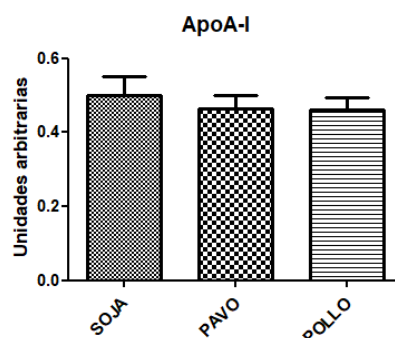
Al igual que se hizo con los machos KO apoE, se determinó la cantidad de ApoA-I y ApoA-IV mediante ELISA tanto en plasmas individuales como en las fracciones de FPLC.

DETERMINACIÓN DE ApoA-I

A) ELISA DE ApoA-I EN PLASMAS INDIVIDUALES

La señal obtenida para la ApoA-I en plasmas de hembras KO ApoE a nivel individual se muestra en la Figura 12. Estos datos indican que no hay ninguna diferencia significativa entre los distintos tipos de dietas proteicas para la expresión de la ApoA-I.

Figura 12: Absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA-I en plasmas individuales de hembras. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student.



B) ELISA DE FRACCIONES PARA ApoA-I

Los resultados obtenidos para los plasmas individuales se correlacionan con los obtenidos en el ensayo de ELISA con las fracciones de FPLC para la determinación de ApoA-I en hembras KO ApoE mostrados en la Figura 13.

Las HDL de mayor tamaño parecen estar más enriquecidas en ApoA-I en el caso de la proteína de soja. Aunque la señal sea superior para esta fuente proteica, no es posible asegurar que haya una cantidad más elevada de ApoA-I en comparación con las otras fuentes proteicas.

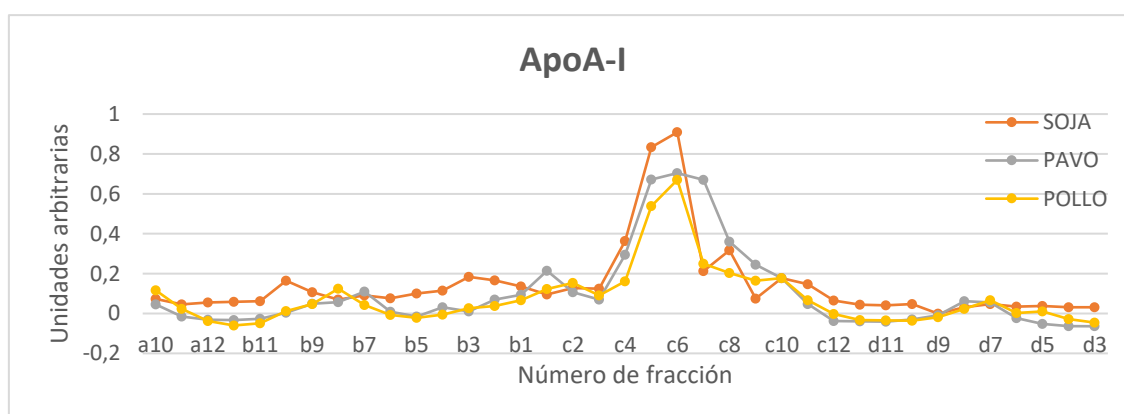


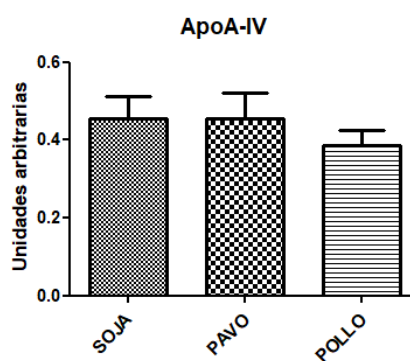
Figura 13: resultado de la absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA-I en hembras frente al número de fracción correspondiente. La curva naranja se corresponde con la señal de ApoA-I obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

DETERMINACIÓN DE ApoA-IV

A) ELISA DE ApoA-IV EN PLASMAS INDIVIDUALES

La señal obtenida para la ApoA-IV en plasmas individuales se puede observar en la Figura 14. A pesar de que el grupo alimentado con proteína de pollo presentó valores menores de ApoA-IV en plasma que el resto de los grupos experimentales, la diferencia no fue significativa después de realizar el test t student.

Figura 14: Absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA-IV en plasmas individuales de hembras. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student.



B) ELISA EN FRACCIONES PARA ApoA IV

En la Figura 15 se muestra la distribución de ApoA-IV en las fracciones lipoproteicas separadas por FPLC de los distintos grupos experimentales para el caso de las hembras. Los resultados no muestran aparentemente ninguna diferencia significativa entre los diferentes grupos en estudio lo que indica que todos ellos tienen cantidades similares de ApoA-IV.

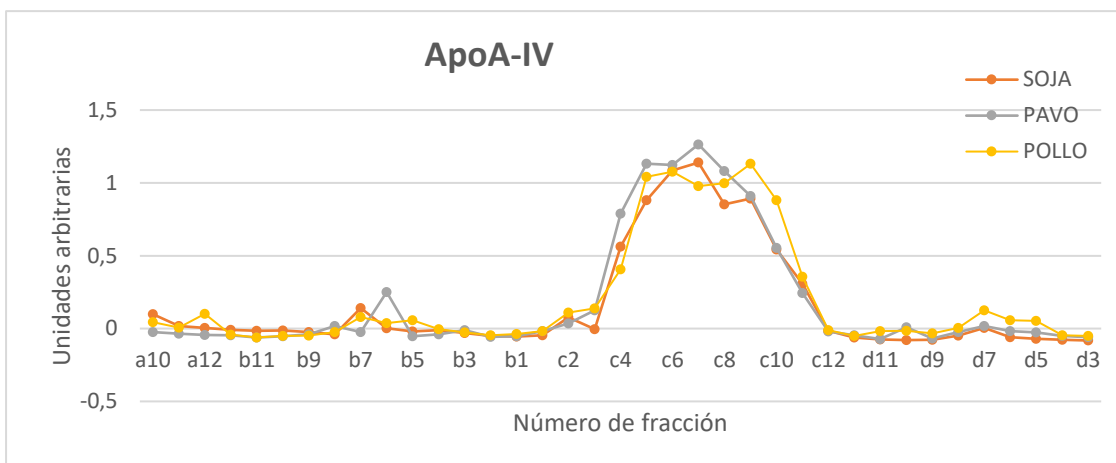


Figura 15: resultado de la absorbancia obtenida en el ensayo de ELISA de ApoA-IV en hembras frente al número de fracción correspondiente. La curva naranja se corresponde con la señal de ApoA-IV obtenida a partir de la dieta de soja, la gris a partir de la dieta de pavo y la amarilla de pollo.

6.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA MEDIANTE ELECTROFORESIS

A continuación, se muestra el resultado de la electroforesis de los RNAs de un conjunto de muestras de ratones KO ApoE. Este mismo procedimiento se repitió con todas las muestras individuales de los ratones de ambos sexos obteniendo el mismo resultado sobre la correcta integridad del RNA.

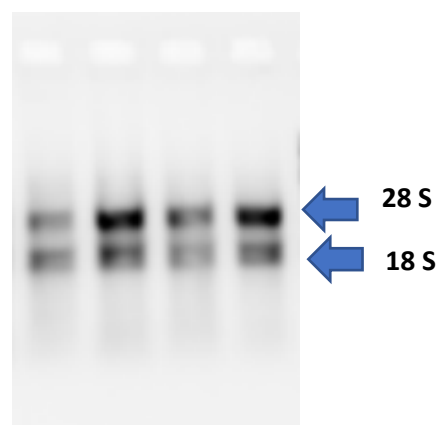


Figura 16: electroforesis de 400ng de muestras de RNA extraído en gel de agarosa al 1% en 1xTBE con bromuro de etidio. Con flechas aparecen marcadas las bandas correspondientes al RNA ribosómico 18S y 28S.

6.4. REAL TIME PCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LAS HDL

6.4.1. CURVAS DE OPTIMIZACIÓN DE PRIMERS

	Primers		Tamaño amplicón	Exones	[primer]	Eficiencia (%)
<i>Abca1</i>	Directo	tagcagcaccgtgtcttgc	101 pb	23	100nM	98,18
	Reverso	cgatgggtcagcgtgtcactt		24		
<i>Lcat</i>	Directo	cgtgggggtggtccatcaag	102 pb	5	100nM	99.00
	Reverso	ttatgcgctgctcctcttca		6		
<i>Srb1</i>	Directo	ctcccagacatgcttccataa	129 pb	4	100nM	102,31
	Reverso	ccatttgtccaccagatggatc		5		

<i>Pon1</i>	Directo	catcccaacggaatgaggatct	135 pb	8	200nM	90.37
	Reverso	ttgcaggacggtaccattctct		9		
<i>Pltp</i>	Directo	actactaagcttggtcgccat	179 pb	1-2	100nM	105
	Reverso	cgtctgggatggtgatggtc		3		

Tabla 2: Secuencia de nucleótidos, localización y concentración de cada primer, así como tamaño del amplicón y la eficiencia resultante de la amplificación.

6.4.2. RESULTADOS REAL TIME PCR

Tal y como ya ha sido descrito previamente en el apartado de Materiales y Métodos, se ha estudiado la expresión de cinco genes relacionados con el metabolismo de las HDL (*Lcat*, *Srb1*, *Pon1*, *Abc1* y *Pltp*) en los animales alimentados con las dietas de soja, pavo y pollo.

A) MACHOS

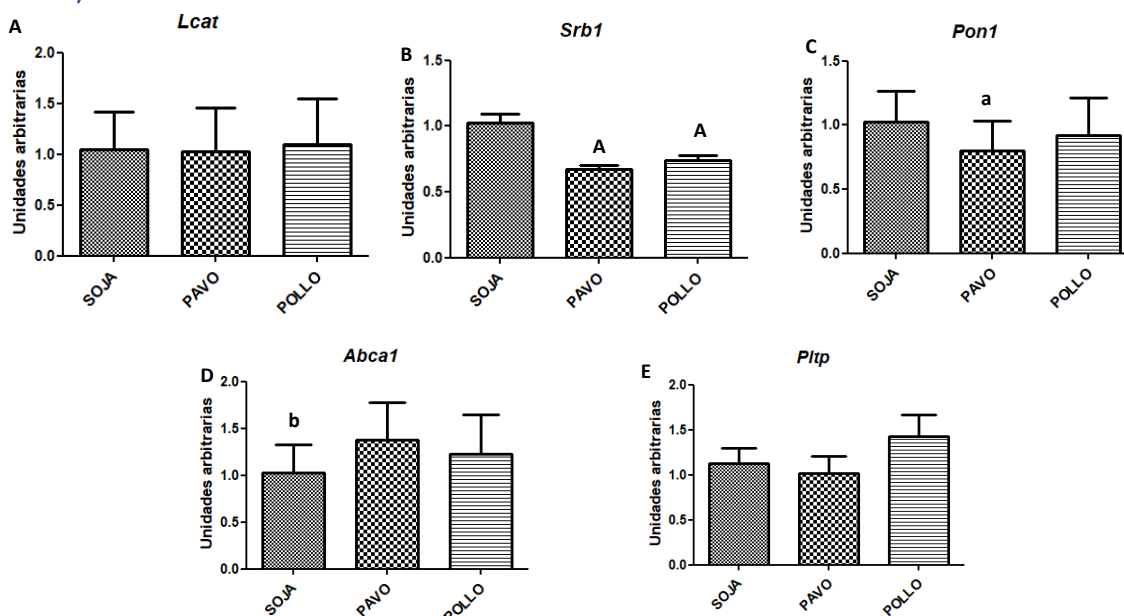


Figura 17: Valores del gen *Lcat* (A), *Srb1* (B), *Pon1* (C), *Abca1* (D) y *Pltp* (E) en machos. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de Mann Whitney o test t student en función de su distribución normal. a, A: $p \leq 0,05$ ó $p < 0,001$ vs. soja; b, B: $p \leq 0,05$ ó $p < 0,001$ vs. pavo y c, C: $p \leq 0,05$ ó $p < 0,001$ vs. Pollo.

Los resultados obtenidos en la Real Time PCR para muestras de machos KO ApoE se muestran en la Figura 17. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de dietas para los genes *Lcat* y *Pltp* (Figura 17 A y E). Por otro lado, los animales alimentados con dietas de carne de ave (pavo y pollo) muestran valores significativamente menores a nivel de mRNA ($p < 0,001$) para el gen *Srb1* si lo comparamos con los valores obtenidos para los animales alimentados con una dieta vegetal de soja (Fig 17 B), no se observaron sin embargo ninguna diferencia significativa entre los grupos de pollo y pavo.

En el caso del gen *Pon1*, los animales alimentados con la dieta de proteína de pavo presentaron un valor significativamente menor ($p < 0,05$) que los animales alimentados con proteína procedente de soja, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de soja vs. Pollo o pavo vs. Pollo (Fig 17 C).

Para el gen *Abca1*, aparece un valor significativamente menor ($p<0,05$) en los animales alimentados con la dieta de soja si lo comparamos con los animales alimentados con la dieta de pavo, no se observaron diferencias significativas entre los demás grupos.

B) HEMBRAS

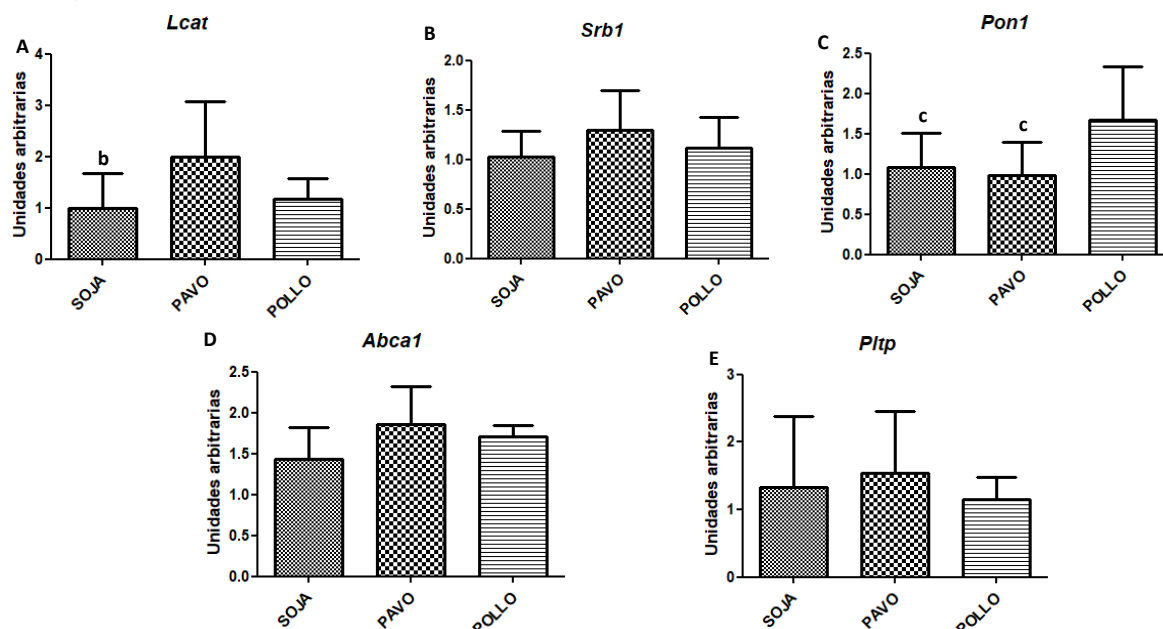


Figura 18: Valores del gen LCAT (A), SRB1 (B), PON1 (C), ABCA1 (D) y PLTP (E) en machos. Resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test de Mann Whitney o test t student en función de su distribución normal. a, A: $p\leq 0,05$ ó $p<0,001$ vs. soja; b, B: $p\leq 0,05$ ó $p<0,001$ vs. pavo y c, C: $p\leq 0,05$ ó $p<0,001$ vs. Pollo.

Los resultados obtenidos en la Real Time PCR para las muestras hepáticas de hembras KO ApoE se muestran en la Figura 18. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de dietas para los genes *Srb1*, *Abca1* y *Pltp* (Figura 18 B, D y E).

En el caso del gen *Lcat*, los animales alimentados con la dieta de pavo muestran un valor significativamente superior ($p<0,05$) si lo comparamos con los valores obtenidos para los animales alimentados con dieta de soja. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de pollo vs pavo o soja vs pollo.

Para el gen *Pon1*, aparece un valor significativamente mayor ($p<0,05$) en los animales alimentados con la dieta de pollo si lo comparamos con los animales alimentados con la dieta de pavo o soja (Figura 18 C). No se observaron diferencias entre los grupos soja vs pavo.

7. CONCLUSIONES

Una vez realizado el análisis de los resultados obtenidos, ha sido posible establecer las siguientes conclusiones:

- No se han visto cambios en los perfiles de distribución del colesterol, fosfatidilcolina y esfingosina en función de la proteína de la dieta para ambos sexos.
- Para los niveles de ApoA-I, no se han visto diferencias significativas entre los diferentes tipos de proteínas dietéticas tanto en machos como hembras KO ApoE. Mientras que en hembras no hay

cambios, en machos KO ApoE, la ingesta de pollo se relaciona con mayores niveles de ApoA-IV en comparación con las otras fuentes de proteínas.

- La ingesta de pavo en machos produce una disminución significativa en la expresión de *Pon1* y un aumento de *Abca1* en comparación con la proteína de soja. Sin embargo, la ingesta de soja está relacionada con una mayor expresión de *Srb1*.
- La ingesta de pavo y pollo aumentan la expresión de *Lcat* y *Pon1* respectivamente en comparación con la dieta de soja en hembras KO ApoE.
- La expresión de *Pltp* no ha sido alterada en los diferentes tipos de dietas para ambos sexos.

8. CONCLUSIONS

Once the analysis of the results obtained has been carried out, it is possible to establish the following conclusions:

- No changes have been seen in the distribution profiles of cholesterol, phosphatidylcholine and sphingosine depending on the diet protein for both sexes.
- In relation with the ApoA-I levels, no significant differences have been observed between the different types of diets in KO ApoE males and females. Whereas in females there are no changes, in KO ApoE males, the intake of chicken causes higher levels of ApoA-IV compared to the other protein sources.
- The intake of turkey in males causes a significant decrease in the expression of *Pon1* and an increase of *Abca1* compared to soy protein. However, soy intake is related to a higher expression of *Srb1*.
- The intake of turkey and chicken increase *Lcat* and *Pon1* expression respectively compared to the soy diet in KO ApoE females.
- The expression of *Pltp* hasn't been altered in the different types of diets for both sexes.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018 Oct 26; 123(10):1118–20.
2. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Mar ;35(3):485–91.
3. Taleb S. L'inflammation dans l'athérosclérose. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016;109(12):708–15.
4. Brief review 1104. 2012.
5. Brunham LR, Hayden MR. Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. *Prog Lipid Res*. 2015;58:14–25.
6. Sips FLP, Tiemann CA, Oosterveer MH, Groen AK, Hilbers PAJ, van Riel NAW. A Computational Model for the Analysis of Lipoprotein Distributions in the Mouse: Translating FPLC Profiles to Lipoprotein Metabolism. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(5).
7. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984;25(12):1277–94.
8. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: Key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res*. 1999;40(1):1–16.
9. Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. *Cell Immunol*. 2018;330(January):27–42.
10. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816(May):3–13.
11. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(5):3–12.
12. Navarro MA, Arbonés JM, Acín S, Carnicer R, Sarriá AJ, Surra JC, et al. Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. *Clínica e Investig en Arterioscler*. 2005;17(2):82–93.
13. Grundtman C. Animal models of atherosclerosis. Vol. 9783709103, *Inflammation and Atherosclerosis*. 2012. p. 133–69.
14. Sfyrí P, Matsakas A. Crossroads between peripheral atherosclerosis, western-type diet and skeletal muscle pathophysiology: emphasis on apolipoprotein E deficiency and peripheral arterial disease.
15. Getz GS, Reardon CA. Thematic review series: Living history of lipids: ApoE knockout and knockin mice: The history of their contribution to the understanding of atherogenesis. Vol. 57, *Journal of Lipid Research*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2016. p. 758–66.
16. Li Y, G Zhang C, Wang XH, Liu DH. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(18):3863–7.
17. Kohan AB, Wang F, Lo C-M, Liu M, Tso P. ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;308:472–81.
18. Navarro MA, Carpintero R, Acín S, Arbonés-Mainar JM, Calleja L, Carnicer R, et al. Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation. *Cytokine*. 2005;31(1):52–63.
19. Yamashita S, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M. Molecular

- mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(5):436–51.
20. Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G. Molecular Sciences Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters.
 21. Trajkovska KT, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: Strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol*. 2017;18(2):149–54.
 22. Ossoli A, Simonelli S, Vitali C, Franceschini G, Calabresi L. Role of LCAT in Atherosclerosis. Vol. 23, *J Atheroscler Thromb*. 2016.
 23. Piper DE, Romanow WG, Gunawardane RN, Fordstrom P, Masterman S, Pan O, et al. The high-resolution crystal structure of human LCAT1. *J Lipid Res*. 2015 Sep 1;56(9):1711–9.
 24. Trigatti BL, Fuller M. HDL signaling and protection against coronary artery atherosclerosis in mice. *J Biomed Res*. 2016;30(2):94–100.
 25. Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol*. 2018;80(3):95–116.
 26. Chowaniec Z, Skoczyńska A. Address for correspondence Funding sources Plasma lipid transfer proteins: The role of PLTP and CETP in atherogenesis. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(3):429–36.
 27. Medina Díaz IM, Murillo González FE, Ponce-Ruiz N, Rojas-García AE, Bernal-Hernández YY, Mackness M, et al. Biomarkers Clinical research. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*. 2019;4:47–54.
 28. Mackness M, Mackness Avenida Príncipe BD, Platja M. HUMAN PARAOXONASE-1 (PON1): GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, PROMISCUOUS ACTIVITIES AND MULTIPLE PHYSIOLOGICAL ROLES. 2015;
 29. Tsui P-F, Lin C-S, Ho L-J, Lai J-H. Spices and Atherosclerosis. 2018
 30. Martínez-beamonte R, Sánchez-marco J, Lázaro G, Barco M, Herrero-continente T, Serrano-megías M, et al. Dietary avian proteins are comparable to soybean proteins on the atherosclerosis development and fatty liver disease in apoe-deficient mice. *Nutrients*. 2021;13(6):1–14.
 31. Bergeron N, Chiu S, Williams PT, M King S, Krauss RM. Effects of red meat, white meat, and nonmeat protein sources on atherogenic lipoprotein measures in the context of low compared with high saturated fat intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2019;110(1):24–33.
 32. Saita E, Kondo K, Momiyama Y. Anti-inflammatory diet for atherosclerosis and coronary artery disease: Antioxidant foods. *Clin Med Insights Cardiol*. 2014;8(Suppl. 3):61–5.
 33. Adams MR, Golden DL, Anthony MS, Register TC, Williams JK. The inhibitory effect of soy protein isolate on atherosclerosis in mice does not require the presence of LDL receptors or alteration of plasma lipoproteins. *J Nutr*. 2002;132(1):43–9.
 34. Bjørndal B, Aloysius TA, Lund A, Slizyte R, Bohov P, Carvajal AK, et al. A chicken protein hydrolysate exerts anti-atherosclerotic effect beyond plasma cholesterol-lowering activity in Apoe^{-/-} mice. *Food Sci Nutr*. 2020;8(7):3052–60.

ANEXOS:

Tabla 1: composición de las dietas experimentales administradas a cada grupo de animales en g/Kg.

Ingredientes (g/kg)	SOJA	PAVO	POLLO
<i>Harina de maíz</i>	371,9	371,9	371,9
<i>Proteína de pavo</i>	-	111,8	-
<i>Proteína de pollo</i>	-	-	111,8
<i>Proteína de soja</i>	111,8	-	-
<i>Maltodextrina</i>	123,8	123,8	123,8
<i>Sacarosa</i>	79,9	79,9	79,9
<i>Aceite de soja</i>	31,9	31,9	31,9
<i>Celulosa</i>	39,9	39,9	39,9
<i>Mix mineral</i>	27,9	27,9	27,9
<i>Mix vitaminas</i>	8,0	8,0	8,0
<i>Bitartrao de colina</i>	2,0	2,0	2,0
<i>L-Cistina</i>	1,4	1,4	1,4
<i>Colesterol</i>	1,5	1,5	1,5
<i>Aceite de palma</i>	200	200	200